Control serológico de grupos de cerdos con y sin vacunación con bacterina para *Actinobacillus pleuropneumoniae*

HUGO DUNLOP BVMS, PhD,
STEVEN MCORIST BVSC PhD.

FUENTE: *Dunlop H, McOrist S. Serologic monitoring of herds with and without bacterin vaccination for Actinobacillus pleuropneumoniae. J Swine Health Prod. 2021;29(1):29-36.*

RESUMEN

Objetivo: Investigar la serología diagnóstica de las infecciones por *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) en cerdos infectados naturalmente y vacunados.

Materiales y métodos: El estado de APP de 12 granjas (A-L) se estableció mediante cultivos de pulmón y serotipificación de aislamientos. El monitoreo mediante el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) detectó anticuerpos contra el antígeno ApxIV o múltiples serotipos de APP. Se realizaron ELISA de serotipos específicos para los serotipos 5 y 7.
Siete grupos de cerdos de la granja F (serotipo 7) se trasladaron a la granja K (serotipo 5). Se utilizaron vacunas autógenas (V1/V2) preparadas a partir de cultivos de APP de serotipo 5 de la granja K y una vacuna comercial de APP muerta (V3) que contenía los serotipos 1, 7, y 15 para vacunar a los cerdos de cada grupo dos o tres veces a intervalos de 3 semanas, comenzando a las 10 semanas de edad. Las muestras de sangre se analizaron con ELISA específicas para el serotipo 5 y las toxinas ApxI y ApxII. Los títulos de suero se compararon mediante un análisis de varianza.

Resultados: Los serotipos 5, 7, 12, o 15 estaban presentes en cultivos pulmonares. La ELISA de monitoreo de ApxIV y la ELISA de serotipo mixto detectaron consistentemente los serotipos 5, 7, y 15. Se detectaron infecciones por el serotipo 12 en la ELISA de serotipo mixto, pero no en las pruebas de ApxIV. La ELISA específica de serotipo 5 o 7 detectó regularmente infecciones en la piara con el serotipo relevante.
Los títulos del serotipo 5 de los cerdos vacunados tres veces con V1/V2 fueron más altos que los que recibieron dos dosis con el volumen equivalente ($P < .05$). Los cerdos que recibieron V3 no mostraron respuesta de anticuerpos del serotipo 5. Los títulos de ApxI y II en cerdos vacunados con V1/V2 fueron más altos que los controles.

Implicaciones: El control y las ELISA específicas de serotipo confirmaron el estatus de APP. Las dosis repetidas de vacuna de APP autógena específica de serotipo proporcionaron una fuerte respuesta de anticuerpos.

INTRODUCCIÓN

La pleuroneumonía porcina aguda causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) sigue siendo un problema clínico importante, particularmente en explotaciones porcinas europeas, latinoamericanas y de Asia Austral; las infecciones subclínicas también son comunes en todo el mundo. Hay 18 serotipos de APP reconocidos, según la composición de polisacáridos de su cápsula[1,2]. Estos antígenos de cápsula específicos de serotipo son factores clave en la reacción inmunitaria del huésped, pero sin proporcionar una protección cruzada heterogénea significativa[1]. La prevalencia de varios serotipos de APP varía globalmente, siendo los serotipos 2 y 9 más comunes en Europa[3] y los serotipos 5, 7 y 12 más comunes en América del Norte y Australia[4,5]. Los aislados de los serotipos 1, 5 y 9 se consideran más patogénicos que otros debido a su mayor expresión de las exotoxinas ApxI y ApxII destructoras de tejidos[6]. Sin embargo, las infecciones con el serotipo 1 ahora son menos comunes debido a su erradicación de muchos rebaños de empresas de cría[4]. Por lo tanto, las infecciones con los serotipos 5 y 9 de APP se consideran de gran preocupación en la actualidad.
La serología es el método preferido para la vigilancia de la APP y la detección de infecciones subclínicas en piaras, con ensayos comerciales establecidos disponibles en todo el mundo. Actualmente, existen tres formatos de antígenos establecidos para las pruebas de serología de APP. Primero, una prueba específica de serotipo basada en el antígeno "O" de lipopolisacárido de cadena larga (LPS) del serotipo individual[7] y segundo, una prueba basada en el antígeno de exotoxina ApxIV[8], que es específico de APP pero no puede diferenciar entre serotipos. Por lo tanto, la segunda prueba tiene como objetivo evaluar el estado de APP de los cerdos. También se ha establecido comercialmente una prueba de detección adicional en el primer formato, mediante el uso

de un grupo de antígenos LPS de cadena larga de varios serotipos. También se ha establecido un tercer tipo de formato de prueba basado en los antígenos de la toxina ApxI o ApxII[9], pero se considera menos específico para la infección por APP y, por lo tanto, menos útil para la detección de la bacteria en los animales. Estudios previos han utilizado estas pruebas serológicas para la exploración de la epidemiología de la APP, el estado del rebaño individual y la respuesta a la vacunación[10-12]. Las muestras de sangre tomadas de cerdos de finalización en etapa tardía (por ejemplo, de 16 a 20 semanas de edad) se consideran las más sensibles para la detección de respuestas de anticuerpos de APP representativas del estado del hato[4,10]. En este estudio, nuestro objetivo fue caracterizar aún más la respuesta serológica de las piaras infectadas con los principales serotipos de APP y la respuesta de los cerdos en un programa de vacunación para el serotipo 5 de APP.

MATERIALES Y MÉTODOS

El Comité de Atención de Ética Animal del Gobierno del Estado de Victoria (Australia) aprobó el uso de animales y los diferentes protocolos de muestreo utilizados en este estudio.

Casos en granjas y estado de la aplicación

Se seleccionaron doce unidades de cerdos de cebo separadas de la "A" a la "L", ubicadas en el este de Australia para la prueba de APP. Estos grupos de crecimiento y finalización se caracterizaron por el consumo cada semana de los cerdos de crecimiento de 10 semanas de edad *(Tabla 1)*. Cada uno de estos rebaños se derivó en rebaños separados de reproducción/cría, ya fuera en el mismo sitio o bajo el mismo sistema de manejo. Todos los rebaños de la "A" a la "K" habían sufrido brotes ocasionales de la enfermedad clínica de APP, pero la ›

Farm	APP culture & serotype*	Finisher herd size†	No. pigs examined‡	Pleurisy exam§	ApxIV serology§	APP 5 serology§	APP 7 serology§	APP mix serology§
A	12	800	36	5/36	0/36	0/36	0/36	5/36
B	12	200	27	1/27	0/27	1/27	0/26	5/26
C	15	480	25	0/21	5/25	0/25	0/25	7/25
D	7,15	800	28	2/28	28/28	1/28	8/25	25/28
E	7	240	29	1/29	8/29	0/29	22/29	16/29
F	7	800	20	0/20	12/20	1/20	3/20	19/20
G	7	400	16	3/16	11/14	0/16	16/16	12/15
H	5	400	30	11/30	23/30	28/29	1/29	28/30
I	5	600	16	5/16	11/15	6/14	0/14	2/16
J	5	800	13	6/13	12/13	12/13	0/13	5/9
K	5	180	20	2/20	17/20	16/20	0/20	20/20
L	ND	800	30	0/30	1/30	0/30	1/30	1/30

* APP culture and serotype identification derived from infected lungs harvested immediately prior to study period.

† Herd size expressed as the average number of pigs in each weekly intake batch of 10-week-old pigs.

‡ Pigs examined and blood collection for ELISA at scheduled slaughter at 23 weeks of age.

§ Results expressed as number of positive/number examined.

ND = none detected.

TABLA 1 Descripción del estado de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) de la granja de estudio y resultados de ELISA para APP.

mortalidad en estos rebaños estuvo constantemente por debajo del 2% en el intervalo desde la admisión hasta el sacrificio durante el período de estudio. Todos los rebaños incorporaron programas de vacunación de rutina para la infección por *Mycoplasma hyopneumoniae*, pero no la vacunación para APP. Los rebaños estaban libres de signos clínicos asociados con el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) y del circovirus porcino tipo 2 durante los 5 años anteriores y durante todo este estudio, según lo observado en los continuos estudios de necropsia, serología específica e inmunohistoquímica.

Además de los datos de resultados históricos de diagnóstico, se recogieron cinco muestras de pulmón de cada granja, algunas con lesiones evidentes de pleuroneumonía, ya sea en la necropsia en la granja o en el sacrificio programado (23 semanas de edad). El cultivo bacteriológico, la identificación bioquímica y la serotipificación de cápsulas para APP se realizaron en cada muestra de pulmón utilizando métodos establecidos5 para confirmar el estado de APP de cada rebaño inmediatamente antes del período de estudio.
Después se rcogieron muestras de sangre de al menos 13 cerdos de cada granja en el momento del sacrificio programado *(Tabla 1)*. Los pulmones de cada cerdo se examinaron visualmente para detectar lesiones de pleuresía. El suero derivado de cada muestra de sangre se almacenó en alícuotas a -20° C, luego se descongeló y se sometió a cuatro ensayos serológicos de APP comerciales separados: 1) ELISA indirecto basado en antígeno ApxIV recombinante (prueba Idexx APP ApxIV ab; Idexx Laboratories Inc); 2) ELISA indirecto basado en extracto de antígeno LPS de cadena larga para los serotipos de APP5 (Swinecheck APP 5a, 5b; Biovet Inc), 4 o 7 (Swinecheck APP 4, 7; Biovet Inc); 3) ELISA indirecto basado en un conjunto mixto de antígenos LPS de cadena larga derivados de grupos de serotipos de APP 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 15 (Swinecheck Mix APP 1-9-11, 2, 3-6-8-15, 4-7, 5 y 10-12; Biovet Inc).
Los análisis ELISA se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante y fueron similares a los descritos anteriormente[7,8]. Brevemente, la dilución apropiada del antígeno LPS o ApxIV se determinó mediante titulación de tablero de ajedrez en placas de microtitulación utilizando tampón de carbonato 0,5 M. Las placas recubiertas con cada antígeno (50 µL/pocillo) se incubaron durante la noche a 4° C. A continuación, las placas se lavaron con solución salina tamponada con *fosfato-Tween 20* al 0,05% (PBST) y se bloquearon con PBST-albúmina de suero bovino (BSA) al 1% durante 1 hora a 20º C. Después de lavar con PBST, se añadieron muestras de suero (diluido 1:100 con PBST-1% BSA); A continuación, las placas se incubaron durante 30 minutos a 37° C. Después de lavar con *PBST*, se añadió IgG anti-porcina de conejo conjugada con peroxidasa (1:10.000; Rockland Immunochemicals, Inc) y se dejó reaccionar durante 30 minutos a 37° C. Las placas se lavaron dos veces con PBST y se dejó reaccionar una solución cromogénica durante 30 minutos a 30° C. La densidad óptica a 490 nm se midió con 650 nm como referencia.
El título ELISA = (absorbancia del valor de la muestra – absorbancia de referencia negativa) ÷ (absorbancia de referencia positiva – absorbancia de referencia negativa).
Las absorbancias típicas de los sueros de referencia

Vaccine group	No. of pigs D0	No. of pigs D64	Dose, mL	No. of doses	Period between doses, wk
1) Control	30	27	0	0	-
2) APP serotype 5 V1†	20	16	1	2	3
3) APP serotype 5 V1†	20	18	1	3	3
4) APP serotype 5 V1†	20	19	2	2	3
5) APP serotype 5 V1†	20	17	2	3	3
6) APP serotype 5 V2†	24	19	2	3	3
7) Commercial APP V3‡	30	27	2	3	3

* Seven groups of cohort pigs, each of individually tagged pigs. Test pigs were given vaccine doses on days 0 and 23; and on day 42 for groups 3, 5, 6 and 7.
† Each dose of V1 and V2 had 1×10^9 *A pleuropneumoniae*/mL.
‡ Each dose of V3 had $> 5 \times 10^8$ *A pleuropneumoniae*/mL.
V1, V2 = separate bacterin vaccines derived from APP serotype 5 isolates from farm K; V3 = commercial APP bacterin vaccine containing serotypes 1, 7 and 15 (Porcilis APPvac; Intervet Co).

TABLA 2 Protocolo de inoculación para cada grupo de vacunación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP).

negativos y positivos fueron de 0,00 a 0,07 y 1,0, respectivamente. Cada ELISA se realizó en lotes incorporando reactivos idénticos.

Programas de vacunación y control

Los cerdos en crecimiento seleccionados para el desarrollo de primerizas a las 10 semanas de edad (n = 164) se ensamblaron y etiquetaron individualmente en la granja "F" (APP serotipo 7 positivo; *Tabla 1*) para el aislamiento previo al movimiento y luego se trasladaron a la granja "K" (APP serotipo 5 positivo; *Tabla 1*).

Siete grupos, cada uno de 20 a 30 cerdos, en la cohorte de cerdos de la granja "F", se inscribieron para evaluar la respuesta serológica a dos vacunas de bacterina de serotipo 5 y una vacuna comercial de APP. El protocolo de inoculación para los grupos 1 a 6 (vacunados) y el grupo 7 (controles no vacunados) se describe en la *Tabla 2*. Los 164 cerdos permanecieron en corrales en un establo grande, con alimento, agua y camas ad libitum. No se administraron antibióticos a ningún cerdo durante el período de estudio. Si bien los cerdos se mantuvieron saludables durante todo el estudio, se retiraron, ocasionalmente, algunos cerdos durante el estudio para fines ajenos al mismo.

Para la producción de bacterina autógena, se expandieron dos cultivos de APP serotipo 5 (V1 y V2) derivados de la granja "K" y finalmente se cultivaron por separado durante 6 horas en recipientes de cultivo de 2 L que contenían caldo de extracto de levadura *Triptona*, con dinucleótido de nicotinamida y adenina añadido (10 µg/mL), y suero bovino inactivado al 5%. A continuación, se analizó la potencia (unidades formadoras de colonias/mL) y la pureza de cada lote mediante cultivos en placas aeróbicas y anaeróbicas de rutina. A continuación, cada lote de cultivo puro se inactivó con una formalina final al 0,2%, se mezcló con la cepa de vacuna final y se añadió un adyuvante de gel de hidróxido de aluminio comercial a 500 µg/ml. Se decantaron partes alícuotas de cada lote final seleccionado en botellas de 100 ml para su uso como vacunas de bacterina autógena específicas para los cerdos.

Se adquirió una vacuna comercial de APP de células completas (V*3; Porcilis APPvac*; Intervet Co), que contiene los serotipos 1, 7 y 15 de APP y el adyuvante comercial, y se usó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

A los cerdos de cada grupo se les dosificó, por vía intramuscular detrás de la oreja, 2 mL de vacuna *V3* (> 5 × 108 APP/mL) o 1 mL (dosis única) o 2 mL (dosis doble) de vacuna *V1* o *V2* (aproximadamente 1 × 109 PPA/mL). Las dosis se administraron dos o tres veces a intervalos de tres semanas, comenzando a las 10 semanas de edad (Día 0 del período de estudio; *Tabla 2*).

La evaluación serológica del estudio de la vacuna se realizó a través de la respuesta al LPS del serotipo 5 de APP y también a las toxinas Apx, ya que se sabe que los serotipos 1 y 5 de APP contienen ApxI y II, mientras que el serotipo 7 solo contiene ApxII5. Se recogieron muestras de sangre de cada cerdo a las 10, 13, 16 y 19 semanas de edad (días 0, 23, 42 y 64). El suero de cada muestra se almacenó en alícuotas a -20° C y se incorporó a: 1) ELISA indirecto basado en extracto de LPS de cadena larga para APP serotipo 5, 2) ELISA indirecto basado en antígeno de toxina ApxI, y 3) el ELISA indirecto basado en el antígeno de la toxina ApxII. Los procedimientos para los ELISA ApxI y II se realizaron de acuerdo con los métodos descritos anteriormente[9,16].

Los antígenos de la toxina Apx recombinante fueron proporcionados amablemente por el Dr. Han Sang Yoo, de la Universidad Nacional de Seúl (Corea del Sur). Brevemente, las placas se recubrieron con el antígeno respectivo a 4° C durante la noche. Los resultados preliminares de la titulación en tablero de ajedrez indicaron que la concentración óptima de antígeno recombinante ApxI y ApxII era de 625 y 100 ng/pocillo, respectivamente. Las placas se lavaron con PBST después del recubrimiento con antígeno y se bloquearon con suero de caballo al 10% durante 2 horas a 37° C. Después de lavar con PBST, se añadieron las muestras de suero (diluidas 1:100 con PBST-BSA al 1%), se incubaron durante 2 horas a 37° C, seguido de lavado e incubación con IgG anti-cerdo de cabra conjugada con peroxidasa (Rockland Immunochemicals Inc), durante 30 minutos a 37° C. Las placas se lavaron dos veces con PBST y se dejó reaccionar una solución cromogénica durante 30 minutos a 30° C. La densidad óptica a 405 nm se midió con 650 nm como referencia. Las mayores diferencias entre los controles positivo y negativo se encontraron con IgG anti-cerdo a una dilución 1:1000 (ApxI) o una dilución 1:2000 (ApxII). Cada título ELISA = (absorbancia del valor de la muestra – absorbancia de referencia negativa) ÷ (absorbancia de referencia positiva – absorbancia de referencia negativa). Las absorbancias típicas de los sueros de referencia negativos y positivos fueron de 0,05 a 0,1 y de 0,1 a 0,15, respectivamente. Cada ELISA se realizó en lotes incorporando reactivos idénticos.

Las diferencias entre los títulos de suero en cada punto de recogida de sangre para cada grupo de cerdos vacunados o de control se compararon mediante un análisis de varianza.

RESULTADOS

Análisis serológico APP en rebaños

Los resultados del cultivo de pulmón para APP y la identificación de los serotipos de APP identificados en cerdos en las granjas "A" a "K" se muestran en la *Tabla 1,* con la presencia en la granja de los serotipos de APP 5, 7, 12 y 15 identificados. Estas designaciones de hatos confirmaron los resultados de las muestras de diagnóstico históricas (datos no mostrados). Solo un rebaño (D) sufrió una aparente infección de serotipo dual con los serotipos 7 y 15. Un rebaño (L) aparentemente no tuvo infección por APP durante el período de estudio.

Los resultados de las pruebas de cuatro APP ELISA separados de muestras de sangre recogidas de cerdos sacrificados de las granjas A a L se muestran en la *Tabla 1.* Los resultados de los exámenes pulmonares para lesiones visibles de pleuresía en estos cerdos examinados también se muestran en la *Tabla 1*. Se observó una proporción de cerdos con pleuresía en rebaños positivos para el serotipo 5 de APP en comparación con aquellos infectados con otros serotipos.

Tanto el ApxIV ELISA como el APP mix-LPS ELISA detectaron regularmente todas las aparentes infecciones de rebaño con 5, 7 y 15 serotipos, aunque con una proporción variable del 14% al 100% de las muestras de sangre analizadas. Sin embargo, mientras que las dos granjas identificadas con infecciones por el serotipo 12 de APP se detectaron en la prueba de ELISA mix-LPS, estas reacciones no se detectaron en los ensayos de prueba de ApxIV realizados en los mismos conjuntos de sueros *(Tabla 1)*. El ELISA que emplea antígeno LPS específico para los serotipos 5 o 7 detectó regularmente infecciones de rebaño con el serotipo relevante, aunque con una proporción del 15% al 100% de las muestras de sangre analizadas. Se detectaron reacciones cruzadas únicas ocasionales con estos ensayos en muestras tomadas de cerdos en piaras no infectadas o en piaras infectadas con otros serotipos *(Tabla 1)*.

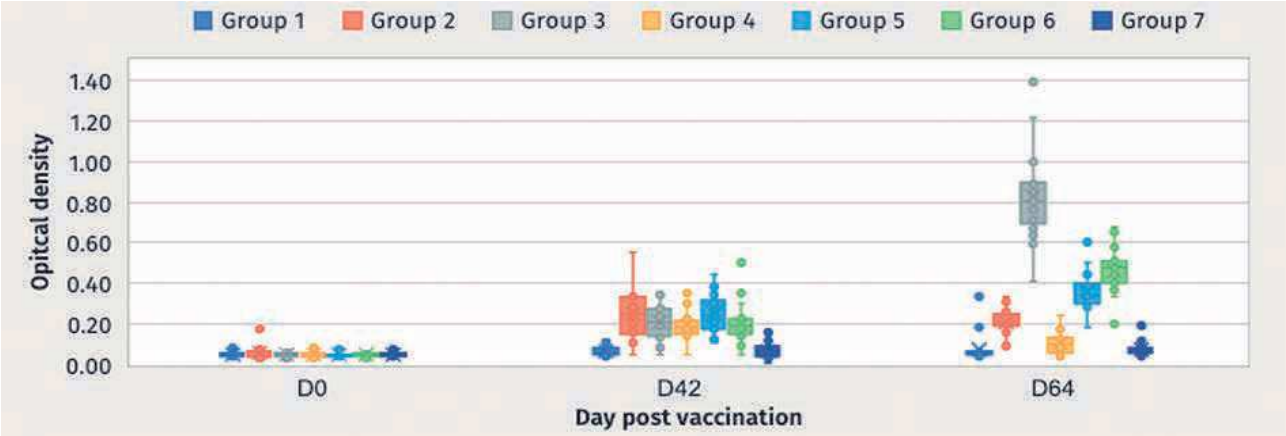

FIGURA 1 Resultados de ELISA para anticuerpos de serotipo 5 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) en sueros de cerdo recogidos en el estudio de la vacuna APP. Se presentan las lecturas de densidad óptica del percentil 50 para los cerdos de cada grupo en cada momento de tiempo después de la vacunación.

Control de vacunación

En las *Figuras 1 y 2*, respectivamente, se muestra un resumen de los resultados de las pruebas ELISA para el estado del serotipo 5 de APP y el estado de anticuerpos contra la toxina Apx de cada grupo de cerdos vacunados y cerdos de control desde el día 0 hasta el día 64. Los títulos específicos de antígeno LPS de los cerdos vacunados tres veces con el serotipo 5 de APP autógeno fueron notablemente más altos en el día 64 que los que recibieron solo dos dosis con los tamaños de dosis equivalentes de 1 ml o 2 ml *(Figura 1)*. El análisis de varianza indicó una diferencia significativa en el día 64 entre los grupos vacunados tres veces con la cepa V1 o V2 del serotipo 5 autógeno (grupos 3, 5 y 6) y sus títulos en el día 0 y el grupo de control en el día 64 (P < .05). Los análisis de otros grupos vacunados el día 64 y de todos los grupos en otros puntos de extracción de sangre no indicaron diferencias significativas en los títulos ELISA detectados con respecto a los del día 0 o del grupo de control.

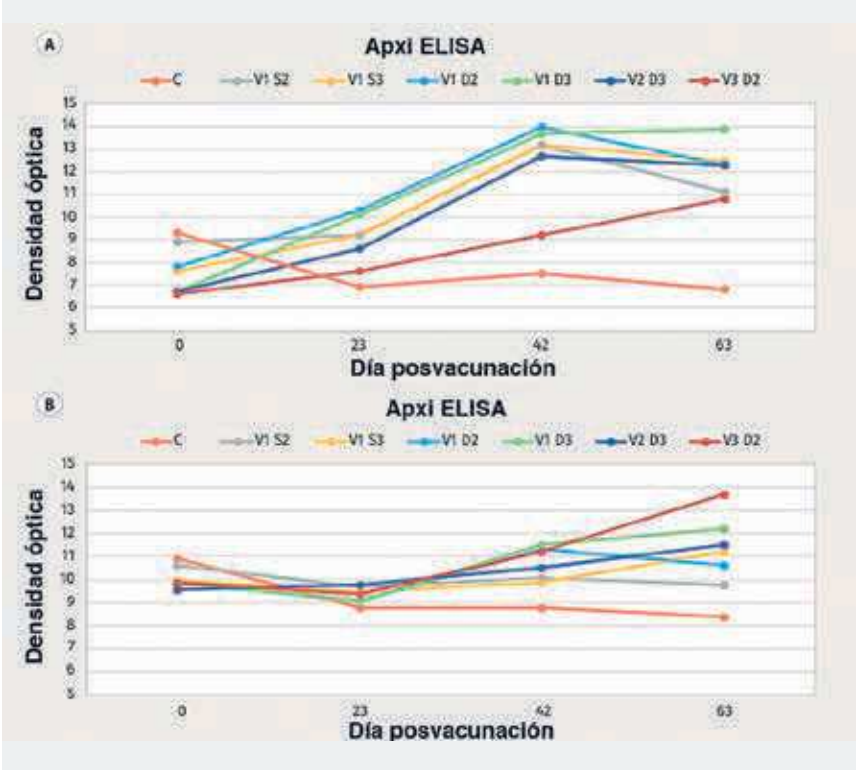

FIGURA 2 Resultados de ELISA para anticuerpos A) ApxI y B) ApxII en sueros de cerdo recogidos en el estudio de la vacuna *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP). Las lecturas medias de densidad óptica se presentan para cerdos (n = 20-30) en cada grupo y en cada punto de tiempo después de la vacunación.

El análisis de anticuerpos frente a la toxina ApxI indicó una respuesta anamnésica notable dentro de cada grupo del programa de vacunas con bacterinas del serotipo 5 (*Figura 2*; grupos 2-6). El análisis de anticuerpos contra la toxina ApxII indicó una respuesta limitada a todas las vacunas de bacterina *(Figura 2)*. Tras el traslado posterior de los cerdos a la granja "K", no se detectó APP clínicamente ni en los exámenes posmortem de los vacunados expuestos durante seis meses.

DISCUSIÓN

El diagnóstico actual para APP del estado individual y del rebaño se establece mediante cultivo de pulmones y serotipificación de cultivos de APP y serología ELISA. Nuestro estudio confirma la relación diagnóstica, generalmente buena, entre las lesiones por pleuresía, los cultivos pulmonares y las técnicas actuales de serología ELISA para una variedad de infecciones del serotipo APP en granjas. La metodología ELISA de antígeno LPS de cadena larga permitió una identificación precisa del estado del rebaño en las 12 granjas examinadas. Está indicado el análisis de muestras suficientes para tener en cuenta las reacciones cruzadas ocasionales. Establecimos que la metodología ELISA del antígeno ApxIV también predijo con precisión el estado del rebaño, a excepción de los dos rebaños que se sabía que estaban infectados con el serotipo 12 de APP. Por el contrario, un estudio de rebaño anterior[12] encontró algunos falsos positivos con el ensayo ApxIV (caso nº 7). Es posible que se requiera el uso de ensayos de antígeno LPS y ApxIV para aclarar completamente el estado de los rebaños con el serotipo 12 de APP. Los ensayos LPS y ApxIV en conjuntos de muestras suficientes se asociaron con investigaciones precisas del estado del rebaño[4,12].

La patogenia de la APP consta de las tres etapas separadas de colonización, resistencia al aclaramiento y daño a los pulmones[13]. Aunque todos los serotipos de APP se consideran patógenos, los exámenes pulmonares para lesiones por pleuresía complementaron la información diagnóstica de los resultados de cultivo y ELISA que confirman la mayor extensión de las lesiones que, probablemente, se observarán con las infecciones por el serotipo 5 de APP. Se considera que esto se debe a una mayor expresión de las exotoxinas Apx, particularmente ApxI y ApxII6. Si bien la patogenicidad de APP en términos de daño tisular varía según el serotipo y el contenido de Apx, la cantidad de animales infectados dentro de un rebaño en particular también puede variar, según serotipo. Nuestro estudio confirma que la monitorización serológica del estado de la manada de APP se logra mejor a través de aproximadamente 30 muestras, de las cuales tres o más resultados positivos ›

claros conducen a una indicación precisa del estado de APP, como también se sugirió anteriormente[4].

La prevención o erradicación de la infección por APP en todos los serotipos sigue siendo difícil de lograr, y se ha demostrado que las estrategias novedosas, como las vacunas vivas atenuadas o los toxoides de la subunidad de la vesícula de la membrana externa, son ineficaces[14]. Las vacunas comerciales de subunidad basadas en los toxoides Apx son eficaces para reducir la fase de daño tisular, pero no parecen impedir la etapa inicial de colonización. Por lo tanto, su uso se considera ineficaz para controlar las infecciones iniciales de APP que conducen a la posible presencia de cerdos portadores entre los rebaños infectados[14,17]. Se sabe que los serotipos 1 y 5 contienen ApxI y II, mientras que el serotipo 7 solo contiene ApxII6. Confirmamos que se produjo una producción notable de anticuerpos contra las toxinas ApxI y II en los cerdos vacunados, en particular los que recibieron la bacterina del serotipo 5 de APP. En nuestro estudio y en otros4, la interpretación de Apx ELISA se consideró más problemática debido a los valores de corte menos seguros y su disponibilidad limitada. Aunque nuestros resultados indicaron que la dosis repetida de vacunas específicas de serotipo de APP se puede controlar con éxito mediante la serología ELISA LPS, estos ensayos basados en el antígeno APP LPS tienen como objetivo la detección del estado de infección en lugar de las respuestas de la vacuna. Es posible que los cerdos vacunados desarrollen reacciones a otros antígenos protectores, no relacionadas con ninguna respuesta detectable de LPS.

El uso prolongado de vacunas de bacterina específicas de serotipo sigue siendo la forma más popular de vacunación de APP, a pesar del tiempo y el esfuerzo considerables que requiere su preparación autógena. Es posible que el uso de vacunas de bacterina pueda conferir cierta protección contra la colonización y cierta protección contra el daño tisular relacionado con Apx. Nuestros resultados indicaron que la dosis repetida de vacunas específicas de serotipo de APP se puede controlar con éxito mediante serología ELISA LPS, con una respuesta anamnésica al antígeno LPS (nótese los títulos en los días 0, 42 y 64 presentados en la *Figura 1*) similar a la de los cerdos vacunados en estudios previos de administración de vacunas de bacterina del serotipo 5 de APP18. Es posible que, en nuestro estudio, la preparación y el uso de material bacteriano sin lavar de células enteras para la producción de las vacunas autógenas pueda haber conferido alguna ventaja protectora en comparación con otros sustratos de vacunas. Estos estudios previos también confirmaron que se requieren dosis repetidas de bacterinas APP para una respuesta medible y que hay poca diferencia en la respuesta del título de antígeno LPS medido en cerdos que recibieron dosis de 1 mL o 2 mL[18]. En nuestro estudio, encontramos que en una se produjo una mayor respuesta con tres dosis de bacterina APP serotipo 5 en comparación con sólo dos dosis. No está claro si esto puede ser útil para todas las bacterinas APP o simplemente para este ejemplo de infección patógena del serotipo 5 de APP. ■

REFERENCIAS BÁSICAS

1. Dubreuil JD, Jacques M, Mittal KR, Gottschalk M. *Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity. *Anim Health Res Rev.* 2000; 1:73-93.
2. Bossé JT, Li Y, Sárközi R, Fodor L, Lacouture S, Gottschalk M, Amoribieta MC, Angene Ø, Nedbalcova K, Holden MTG, Maskell DJ, Tucker AW, Wren BW, Rycroft AN, Langford PR, BRaDP1T consortium. Proposal of serovars 17 and 18 of *Actinobacillus pleuropneumoniae* based on serological and genotypic analysis. *Vet Microbiol.* 2018; 217:1-6.
3. Šatrán P, Nedbalcová K. Prevalence of serotypes, production of Apx toxins, and antibiotic resistance in strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated in the Czech Republic. *Vet Med* (Praha). 2002; 47:92-8.
4. Gottschalk M. Detection of Actinobacillus pleuropneumoniae antibodies. Proc ISU *Swine Disease Conf*. 2012; 20:125-32.
5. Blackall PJ, Bowles R, Pahoff JL, Smith BN. Serological characterisation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pigs in 1993 to 1996. Aust Vet J. 1999; 77:39-43.

6. Beck M, van den Bosch JF, Jongenelen IMCA, Loeffen PLW, Nielsen R, Nicolet J, Frey J. RTX toxin genotypes and phenotypes in *Actinobacillus pleuropneumoniae* field strains. *J Clin Microbiol*. 1994; 32:2749-54.
7. Gottschalk M, Altman E, Charland N, De Lasalle F, Dubreuil JD. Evaluation of a saline boiled extract, capsular polysaccharides and long-chain lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 as antigens for the serodiagnosis of swine pleuropneumonia. *Vet Microbiol.* 1994; 42:91-104.
8. Dreyfus A, Schaller A, Nivollet S, Segers RPAM, Kobisch M, Mieli L, Soerensen V, Hüssy D, Miserez R, Zimmermann W, Inderbitzin F, Frey J. Use of recombinant ApxIV in serodiagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections, development and prevalidation of the ApxIV ELISA. *Vet Microbiol.* 2004; 99:227-38.
9. Shin M, Kang ML, Cha SB, Lee W, Sung JH, Yoo HS. An immunosorbent assay based on the recombinant ApxIa, ApxIIa, and ApxIIIa toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its application to field sera. *J Vet Diagn Invest*. 2011; 23:736-42.
10. Opriessnig T, Hemann M, Johnson JK, Heinen S, Giménez-Lirola LG, O'Neill KC, Hoang H, Yoon K, Gottschalk M, Halbur PG. Evaluation of diagnostic assays for the serological detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* on samples of known or unknown exposure. *J Vet Diagn Invest.* 2013; 25:61-71.
11 Jung M, Won H, Shin M, Oh MW, Shim S, Yoon I, Yoo HS. Development of *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxI, ApxII, and ApxIII-specific ELISA methods for evaluation of vaccine efficiency. *J Vet Sci*. 2019;20(2):e2. doi:10.4142/jvs.2019.20.e2
12. Broes A, Martineau GP, Gottschalk M. Dealing with unexpected *Actinobacillus pleuropneumoniae* serological results. *J Swine Health Prod.* 2007; 15:264-9.
13. Bossé JT, Janson H, Sheehan BJ, Beddek AJ, Rycroft AN, Kroll JS, Langford PR. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes Infect*. 2002; 4:225-35.
1.4 Antenucci F, Fougeroux C, Deeney A, Ørskov C, Rycroft A, Holst PJ, Bojesen AM. In vivo testing of novel vaccine prototypes against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Res.* 2018; 49:4. doi:10.1186/s13567-017-0502-x
15. Gottschalk M. Actinobacillosis. In: Zimmerman JJ, Karriker L, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, eds. *Diseases of Swine.* 10th ed. Ames, IA: Wiley-Blackwell; 2012:653-69.
16. Teshima K, Lee J, To H, Kamada T, Tazumi A, Hirano H, Maruyama M, Ogawa T, Nagai S, Turni C, Tsutsumi N. Application of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 15 in pig sera. *J Vet Med Sci.* 2017; 79:1968-72.
17. Sjölund M, Wallgren P. Field experience with two different vaccination strategies aiming to control infections with *Actinobacillus pleuropneumoniae* in a fattening pig herd. *Acta Vet Scand.* 2010; 52:23. doi:10.1186/1751-0147-52-23.
18. Rousseau P, Assaf R, Boulay G, Désy M. Immune response to an *Actinobacillus pleuropneumoniae* vaccine in swine. *Can Vet J.* 1988; 29:989-92.